低栄養微生物としての酵母

兎束保之*

土壌酵母の生理学から導かれた新しい考え方

アルコール発酵を通じて人類と 5000 年以上もの付き合いが続いている酵母の中に意外な秘密がかくされていた。蒸溜水と寒天だけで作った平板培地上でコロニーを作る酵母がいるという。しかもそうした性質を示す酵母は思いの外に多いらしい。

酵母という言葉からは、日本酒、ビール、ワインなどのアルコール飲料が真っ先に連想され、次いでパン、味噌、醤油が思い浮かぶ。これらはいずれも日常生活に密着した発酵食品であり、酸素が乏しい環境下では糖からエタノールと二酸化炭素を作り出す酵母の発酵能力を人間が巧みに利用した生産物である。

こうした日常の出来事から、酵母とは人間生活を豊かにする発酵性微生物というイメージにつながりやすい。これを裏付けるかのように、酵母の分類・同定を行なう上で求められる主要な生理学的試験法は、様々な糖を炭素源として与えたときの発酵性と資化性である⁽¹⁾。発酵現象の解析⁽²⁾を中心に酵母の研究が発達してきたといってもよいであろう。ところが、酵母の性質・分類を取り扱った成書⁽³⁾を開くと、590 の種が記載されているが、その中には糖を発酵する能力をまったく持っていない種が 258 もあるのに驚かされる。

一方、酵母とはどのような生物を指すか⁽⁴⁾といえ、ば、「主として出芽で増殖し、単細胞世代が長く、単細胞の増殖で形成するコロニーは毛状にならず、白色ないし明色の糊状となる」と定義されている。しかし、現実には分裂で増殖するものがあったり、色素を生産する種が存在し、定義づけすら困難な一群の生物である。したがって、酵母に関する知識はまだ限定された範囲に留まっており、未知の性質や隠された能力の多様性に出会う機会は大いに残されていると期待できる。

発酵現象の解析を中心に発達してきた酵母の研究では、発酵を観察しやすい培地を使用するのが当然であろう。さらに発酵生産物をアルコール飲料として利用する目的を持てば、発酵出発原料中には単に酵母の増殖を支えるだけではなく、製品の最終アルコール濃度を人間の好みに合わせる必要がある。必然的に発酵出発原料中には相当高濃度の糖と窒素源、リン酸塩、その他の無機イオン類、ビタミン類などが含まれている。こうした事情を背景にして、マニュアル化された酵母の研究・取扱法を用いて実験を進める限り、酵母を低栄養条件下で増殖させる機会は減多に訪れない。

筆者の研究室では、約 20 年にわたって糖を発酵しない酵母 *Lipomyces starkeyi* を実験材料として取り扱ってきた⁽⁵⁾。この酵母は、その属名が示すように、菌体内部に脂肪球を形成しながら大量の油脂（主としてトリアシルグリセロール）を蓄積する性質がある。この脂肪球の形態形成は顕微鏡で観察できる現象である。その形態形成機構を生化学の言葉で説明することを目的として、生理学的実験を仲立ちとした解析を続けてきた。当初の実験では 1 つの菌株だけを使用していたが、実験結果の一般性を求めて世界各国から同じ種の分譲菌株を集めようとした⁽⁶⁾。ところが、収集できる菌株数があまりにも少ないのに落胆し、ならば我が研究室の手で野外株を分離しよう決心した。これが低栄養条件下で酵母の増殖を観察するチャンスにつながった。本稿では、筆者の研究の発案から具体的手法の選び方、および研究結果の幾つかを紹介したい。

Yeasts as Oligotrophic Microorganisms—a New Concept
Derived from Soil Yeast Physiology

* Yasuyuki UZUKA, 山梨大学工学部

自然界からの *Lipomyces* 属酵母の分離

米国の微生物学者 R. L. Starkey は、1946 年に新しい油脂酵母を土壌から分離した⁽⁷⁾。これが後に *Lipomyces starkeyi* と学名を与えられた酵母である。ある種の酵母が菌体中に油脂を蓄積する現象は比較的古くから知られており、すでに第一次、第二次世界大戦中にドイツで食料資源として利用する試みがあった⁽⁸⁾。Starkey が発見した酵母は菌体重量の 65% もの油脂を蓄積するというので注目されたが、やがて好転した食料事情に押されるようにして話題から遠のいた。

筆者らが注目したのは Starkey がこの酵母を発見するに至った経過である。本来は土の中に棲息する窒素固定細菌を分離する目的で、無窒素寒天培地上に少量の土を撒いておいたところ、細菌のコロニー出現から数日を経て、この酵母のコロニーが現われた。さらにその後、50 年近くの間に発見された *Lipomyces* 属の酵母全 5 種 (*L. anomalus*, *L. japonicus*, *L. kononenkoae*, *L. starkeyi*, *L. tetrasporus*) はことごとく土から発見されている⁽⁹⁾。これらの文献調査結果と筆者らが蓄積した過去の実務経験を組み合わせれば、日本の土壌からも *L. starkeyi* を分離できるだろうと予測した。

この酵母は Wickerham の合成培地⁽¹⁰⁾に記載

図 1 ■ 無窒素寒天培地上での野外土壌酵母のコロニー形成

メンブランフィルター上に丸く光っているのが酵母のコロニー、左側にはカビのコロニーが見える。神奈川県相模原市の竹林にて土壌試料を採取 (1989 年 1 月 5 日)

されている無機塩類とグルコースだけから成る液体最少培地中で増殖する。この培地の窒素源である硫酸アンモニウムを除去し、寒天を 2% 加えた固体平板培地を分離用に使うことにした。日本の野外から採取した土は湿り気が高いので平板培地上に撒きにくい。そこで、ひとまず水に懸濁し、数分後に上澄画分を直径 47 mm, 孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した。そのフィルターの濾過面を上にして上記の無窒素寒天平板培地上に置き、22°C, 20 日間保温したところ、半透明の糊状コロニーがフィルター上に出現してきた⁽¹¹⁾ (図 1)。

糊状コロニーの一部をかき採って顕微鏡観察すると、平素の実験で見慣れている脂肪球を持ち、出芽している細胞が現われた。コロニー中の細胞を滅菌水で希釈しては再び上記の無窒素寒天平板培地上に塗布してコロニーを出現させる方法で純化し、最後にマイクロマンピュレーターで単細胞分離する操作を経て、純粋分離株とした。純粋分離された菌株はいずれも菌体内部に脂肪球を持ち、多くは細胞から外側へ発達する胞子嚢を形成する。グルコースを発酵せず、デンプンを資化し、0.1% シクロヘキシミドに耐性があることなどから、*Lipomyces* 属とその近縁属 (*Waltomyces* 属, *Myxozyma* 属) 酵母であることが確認された。山梨県を中心とする日本各地の数多くの採取土壌の大部分からこのような酵母が分離できた (表 1)。これらの酵母の属および種の厳密な同定試験は現在進行中であるが、胞子の表面形態、ユビキノ分子種の分析からは過半数が *L. starkeyi* で

表 1 ■ 採取土壌試料とそこからの *Lipomyces* 属および近縁属酵母の検出

土壌採取場所	試料総数	検出できた試料数
雑木林	19	16
檜, 松, 杉, くぬぎ, 白樺などの純林	12	11
竹林および竹藪	4	4
田の畦道	2	2
畑	15	9
草原および牧草地	6	6
神社, 学校などの木の下や花壇など	18	15
溶岩地帯	2	0
計	78	63

あると考えられる。

低栄養平板培地上での酵母の増殖

Lipomyces 属酵母が無窒素寒天培地上でコロニーを形成する事実を目の前にして、この酵母はどのようにして窒素源を獲得しているかを説明する課題が出てきた。それと同じ程度の重要さで、窒素源以外の重要な栄養物質を除去した寒天培地上でも増殖が起こるのか、という課題の解決にも迫られた。実験的には第2の課題を解決するほうが簡単なので、そちらから着手した。

1. 寒天平板培地上での *L. starkeyi* の増殖

増殖に足だけの栄養物質を含んだ平板培地上に1個の細胞が置かれると増殖を繰り返し、やがて肉眼で明瞭に判別できるほど大きいコロニーが形成される。平板培地中の栄養物質が通常の実験条件に比べて極端に低濃度だったり（以後、この状態を低栄養と呼ぶ）、栄養物質相互の濃度がアンバランスだと増殖に障害が起こり、コロニー形成までには至らないであろう。また平板培地上に置かれた種菌がすでに死に至っていたり、増殖できないほど重大な損傷を受けていた場合もコロニーは形成されない。低栄養の平板培地上における増殖の可能性を肉眼観察で量的に取り扱う、すなわち充分な低密度分散状態で接種された細胞から可視的コロニーが形成された数を求めるには、平板培地上に接種された酵母細胞の単純な数だけではなく、それらの生死あるいは増殖を可能とさせる活力を厳密に把握しておかないと誤った判定を下すことになる。

酵母細胞が増殖して1個のコロニーを形成するとき、増殖の出発点になる1個あるいは複数個の細胞をコロニー形成単位 (colony forming unit: CFU) という⁽¹²⁾。酵母の多くは出芽法で増殖し、母細胞の大きさに比べて娘細胞が小さい段階では、まだ核の分裂を完了していない⁽¹³⁾。この場合には母細胞と娘細胞が結合している状態が CFU となる。核の分裂が完了していても、攪拌や振動などの簡単な物理的手法では母細胞と娘細胞を分離できない場合がある。したがって、平板培地上

に分散接種された細胞から出発して何個のコロニーが形成されるかを定量的に判定するには、接種時の単純な生細胞の数ではなく、増殖可能な細胞を1個以上含んだ CFU の数が問題になる。CFU を簡単に決定する方法として、エリトロシン B 染色法を採用した。この色素は増殖能力のない細胞を赤く染めるが、能力のある細胞は染色しない。幸い、この染色法で判定した CFU 数と酵母エキス (Y) と麦芽エキス (M) で栄養源を充分に与えた YM 寒天平板培地上で形成されるコロニー数は、よい一致をみることをすでに確かめてあった⁽¹⁴⁾。

斜面培地上に保存しておいた *L. starkeyi* を液体最少培地⁽¹⁵⁾で増殖させ、滅菌した蒸留水で充分に遠心洗浄して菌体周辺の持ち込み培養液を除去した。なお、本稿で蒸留水と記載するときは、ガラス器具だけを使って前溜および後溜を捨てながら蒸溜を3回繰り返して得た水を指す。菌体内部に保持されている蓄積栄養物質を消費させる目的で、菌体を蒸留水に分散させた状態で 25°C、24 時間好気的条件下にさらした。つまり可能なかぎり厳密に低栄養条件を作るために手間を惜しまなかった。これらの準備段階で増殖能力を失う細胞があることも配慮して、平板培地への接種直前に CFU を測定した。

図 2 ■ 寒天と蒸留水だけで作ったゲル上における *L. starkeyi* のコロニー形成
25°C, 30 日間保温

1 枚の平板培地に 50 CFU ずつ接種されるように細胞濃度を調節した。試験する低栄養平板培地に対して比較対照する目的で YM 平板培地をも使用した。YM 平板培地上に形成されたコロニー数に対して、低栄養平板培地上で形成されたコロニー数が 50% を超えるときはプラス (+) と判定し、それより少ないときはマイナス (-) とすることにした。実験結果が確かにマイナスになる比較対照系を作っておく意図で、寒天と蒸溜水だけで作った平板培地を用意した。

実験結果は図 2 に示した 1 枚の写真で充分であろう。蒸溜水と寒天だけで作った平板培地上にコロニーが形成され、そのコロニー数は明らかにプラスと判定できるほど多かった。はじめは何かの手違いかと考えて再実験をしてみたが、結果に変わりはない。マイナスと判定される実験系を起点として、そこへ栄養物質を与える段階を経てプラスの方向へと誘導したいとする思惑は、放棄せざるを得なくなった。

寒天の精製度が問題になると考えて、目的別に販売されている微生物実験用の商品を 3 社のメー

カーから購入して試験しても、ほとんど同じ実験結果しか得られなかった。寒天原料を精製して得られるアガロースをゲル化剤として使ってもコロニーは形成された。しかし、同じ日数の培養では寒天ゲルに比べてコロニーのサイズが小さかった。それゆえ、寒天中に含まれている物質群を主たる栄養源として酵母は増殖していると推定された。

この点を実験的に確かめてみるため、以下のような実験を行なった。市販のアガロース粉末を重量で 50 倍の蒸溜水に懸濁し、マグネチックスターラーで 24 時間攪拌後に遠心分離して上澄（洗浄液）と沈澱に分ける。沈澱したアガロースを再び蒸溜水に懸濁・攪拌する操作を 5 回繰り返し、最後に得た洗浄アガロースと新しい蒸溜水でゲルにし、平板培地とした。この平板培地上に菌体を接種してコロニー形成数を測定したところ、未洗浄アガロース系に比べて明らかに減少した。この実験から、寒天やアガロース中に不純物として含まれる物質群が酵母の増殖を支えていることが明らかになった。ちなみに、アガロース洗浄液に電

表 2 ■ 寒天およびアガロース中の元素分析

全含有量 (μg/g)					可溶化量*1 (μg/g)			
寒天		アガロース			寒天		アガロース	
A	B	電気泳動用	等電点電気泳動用		A	B	電気泳動用	等電点電気泳動用
グルコース					18.4	10.4	2.4	20.4
NH ₃ -N					4.8	35.2	1.2	1.7
N	20.0	240.0	—	—				
P	145.6	55.0	1.2	8.8	114.2	85.7	—	—
K	64.7	119.1	—	53.1	46.8	85.7	—	54.0
Mg	537.9	122.2	1.1	13.2	354.0	54.2	0.1	7.9
Na	2850.8	3366.4	1368.9	599.1	2437.0	2191.4	461.3	497.6
Ca	342.6	283.9	227.6	197.8	379.6	233.9	1.0	79.6
Mn	15.6	1.7	—	0.3	5.7	0.6	—	0.2
Zn	0.3	0.7	0.2	2.4	0.6	1.1	—	—
Fe	77.5	16.2	4.5	17.4	7.4	5.1	0.5	4.0
Cu	0.6	—	—	0.4	—	—	—	—
Mo	—	—	—	—	—	—	—	—
B	75.5	14.2	30.5	9.7	42.8	14.9	39.4	9.4
I	—	—	—	—	—	—	—	—
(T)*2	(4131.1)	(4219.4)	(1634.0)	(902.2)	(3392.9)	(2707.8)	(503.5)	(654.4)

分析方法 N：セミマイクロケルダール法 (BÜCHI 322 distillation unit-BÜCHI 342 control unit), グルコース：ムタローターゼ・GOD 法 (glucose C-test Wako), NH₃-N：インドフェノール法 (ammonia-test Wako), その他の元素：HNO₃-H₂SO₄-H₂O₂ 分解後、ICP 発光分光器 (SEIKO SPS 1200 VR plasma spectrometer) で測定

*1 10 g の試料を 3 回蒸溜した水 80 ml に懸濁後、24 時間振盪 (100 rpm, 室温)

*2 (T)：元素の総量、可溶化量の場合にはグルコースを除く元素量

—：検出限界以下

気工用テスターの端子を入れると電流が測定できた。したがって、可溶性の栄養物質が相当大量にアガロース中に含まれていることになる。

続いて行なった寒天とアガロースの灰化物中の元素の定性的、定量的分析結果を表2に示した。これらの相当部分が水溶性物質として寒天やアガロース中に存在している。また、少量ではあるがアンモニア態窒素とグルコースも存在した。一方で、蒸溜水の代わりに逆浸透膜処理で調製する集積回路製造用の超純水を使って未洗浄アガロースとゲルを作っても、そのゲル上に形成されるコロニー数は減少しなかった。したがって、平板培地作製用の蒸溜水が酵母の増殖を支える主要な栄養源になる可能性はきわめて低いことになる。*L. starkeyi* が寒天と蒸溜水だけで作った平板培地上でコロニーを作れる原因がわかってしまったので、Starkey が窒素源を与えない寒天平板から *L. starkeyi* のコロニーを最初に分離できた理由は解析できたことになる。この酵母はゲル化剤として2%だけ加える寒天に含まれている程度の少量の炭素源と無機塩を集めて増殖する能力を持っている、と考えるのが正しい見方であろう。

通常の細菌用平板培地に与える栄養物質濃度に比べて100分の1の低濃度にしか栄養源を与えていない培地上で増殖が確認できる細菌を低(濃度)栄養(性)細菌(oligotrophic bacteria)と呼んでいる⁽¹⁶⁾。低栄養細菌に関する研究は土壤微生物学の分野では数多くの報告が出ている。ところが、酵母を主役として取り扱った論文は調査をしても見つからない。筆者らの実験では、栄養物質を積極的に与えていない寒天ゲル上にコロニーが形成されたのであるから、実験に使った酵母 *L. starkeyi* は低栄養酵母の一つと考えるべきであろう。

酵母の増殖を取り扱う実験を行なうとき、栄養という言葉をもどのように定義づけ、その範囲に入る物質群をどの程度与えた培地を作ればよいのであろうか。すでに増殖した菌体を分析の対象として、そこから検出される元素とエネルギー供給源としての有機化合物を考えれば一つの解答になる。この考えはパスツールが酵母を焼いて得た灰

とブドウ糖で培地を作った実験以来の伝統的考え方である⁽¹⁷⁾。分析に供した菌体が健全な組成を持っていたかと問われると、何をもって健全な菌体と定義するかという難問が控えている。寒天やアガロースには定性的にさまざまな物質が含まれているだけに、これらをゲル化剤として使う平板培養実験を主要な研究手段としながら、これらの難問に答えるのは大変難しい。解決へ踏み出すには可能なかぎり純度の高い試薬を蒸溜水に溶解させた液体培地を使う必要がある。

その前に、寒天やアガロースゲル上にコロニーを形成するほど増殖できる酵母は *L. starkeyi* だけであるのか確かめておく必要があった。

2. 低栄養平板培地上でのさまざまな酵母の増殖

L. starkeyi は土壌から分離される酵母であり、通常の土壌中の栄養物質濃度は、実験室で使う普通の培地中のそれより低いと考えて差し支えないであろう⁽¹⁶⁾。一般的な畑では、ヘクタールあたり7トン前後の土壤生物が存在し、その20~25%が細菌、70~75%がカビ、残りがダニ、ミミズなどの土壤動物だという⁽¹⁸⁾。酵母について記載例を探すのは困難であるが、筆者らの経験では桁違いに低いことだけは確かである。そうした事情を反映しているためか、土壤酵母に関する総説を探してもきわめて限定された数しか見当たらない^(19,20)。栄養物質濃度が低く、しかも細菌、放線菌、カビという生存上の競争相手が群がるほどいる土壌の中で酵母が生き残るには、他の微生物では利用できないほど低濃度の栄養物質を上手に利用する能力が不可欠なのではないかと考えた。この思考方向が正しいのなら、土壌を分離源とする酵母と、人間が食品として利用できるほど栄養物質濃度が高い果実や漬物を分離源とする酵母とでは、増殖に必要な栄養物質濃度に差異が存在するであろう。それを期待しつつ、菌株保存機関の分譲菌株リストから分離源を土壌とするものと、果実などの高栄養源とするものを中心に15属38菌株を選び出して購入した。

コロニーを形成させる平板培地中に溶解させる栄養物質の種類は、5段階を経て前述の最少合成

表 3 ■ 供試酵母菌株の 12 種の平板培地における増殖能力

寒天培地					アガロース培地					菌株	区分
寒天のみ	+Bio	+V9	+無機塩類	+無機塩類+V9	Y M	アガロースのみ	+Bio	+V9	+無機塩類		
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Lipomyces starkeyi</i> IAM 4753, CBS 1807, <i>L. konoenenkoeae</i> IFO 10375, <i>L. tetrasporus</i> CBS 5910, <i>Hansenula saturnus</i> R 263, <i>Candida boidinii</i> AJ 4779, IFO 10035, <i>C. hydrocarbofomaria</i> IFO 1973, <i>Cryptococcus humicolus</i> JCM 1457, <i>Cr. laurentii</i> IFO 12264, <i>Rhodotorula glutinis</i> JCM 5949, <i>Rh. rubra</i> IAM 12232, <i>Rhodospiridium diobovatum</i> IFO 1829, <i>Rhodosp. toruloides</i> IFO 0871, <i>Sporidiobolus pararoseus</i> JCM 5350, <i>Sporid. ruinemii</i> IFO 1689	A
+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>L. japonicus</i> JCM 7254, <i>Torulaspora pretoriensis</i> JCM 3662	B
+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Myxozyma geophila</i> JCM 5220, <i>M. melibiosi</i> CBS 2102, <i>Debaryomyces hansenii</i> JCM 5205, <i>Deb. polymorphus</i> JCM 1628, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4274, <i>T. delbrueckii</i> JCM 2204, <i>Filobasidium capsuligenum</i> IFO 1119	C
+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	<i>Sacch. cerevisiae</i> JCM 5917	D
+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Waltomyces lipofer</i> IFO 1288	E
-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>C. versatilis</i> IFO 10038	F
-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Sacch. cerevisiae</i> IFO 0847	G
-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i> IFO 1806	H
-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>Zygosacch. fermentati</i> IFO 0851	I
-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	<i>L. anomalus</i> JCM 5988, <i>Sacch. servazzii</i> JCM 5179, JCM 5200, <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 1011, IFO 0342, <i>T. globosa</i> IFO 0073, <i>Zygosacch. rouxii</i> JCM 5924	J

+Bio: ビネチン添加, +V9: 可溶性ビタミン9種添加

培地に近づくように組み立てた。5段階の内訳は、最も低栄養な培地としては一切の栄養物質を加えない蒸留水だけとし、次の段階ではビタミンB群の中からビオチンだけを与える。ビオチンは比較的多くの酵母の増殖にとって必須生育因子となっているからである。第三段階では Wickerham の合成培地組成⁽²⁰⁾に記載された9種の可溶性ビタミンすべてを与えた。発酵性の酵母の幾つかがこれらのビタミン数種を、生育因子として要求する経験を基本にしている。第四段階では合成培地の中には必ず溶解させる無機塩類のすべてを与え、第五段階では無機塩類とビタミン9種を与えた。比較対照系として前述の最少培地と、これまでに研究の対象として取り扱われたほとんどすべての酵母に増殖を許す YM 寒天培地を使用し

た。ゲル化剤には寒天とアガロースを使って合計12種類の平板培地を用意した。培養温度は酵母の分類同定に使われる 25℃を採用した。

実験結果は、表3に示したように、アガロースと蒸留水だけで作ったゲル上で可視的コロニーとして確認できるほど増殖するのは、15属38菌株の酵母のうち16株に達した。これらの酵母は他のすべての培地上でもコロニーを形成した。蒸留水と寒天で作った平板培地上でコロニー形成した酵母は過半数の27菌株にものぼった。実験に使用した酵母は土壌を分離源とする菌株数が多くなるように作意的に選んだとはいえ、増殖可能菌株数の大きさは予想を上廻っていた。もはや *L. starkeyi* の特殊な性質として単純な寒天ゲル上にコロニーを形成するのではなく、子囊菌系、担子

菌系，不完全菌系に属するかなり広い範囲の酵母が同じ性質を示すと判定せざるを得なくなった。

栄養物を段階的に加えてゆくにつれて平板培地上で増殖する酵母数が明らかに増加した。表3のB, C, D, Eに分別された酵母は栄養物質無添加の寒天ゲル上で増殖したが，アガロースゲル上では無機塩類を与えなければ増殖しなかった。寒天中に比べてアガロース中の無機塩濃度が低い（表2）からと説明できる。培地に加えた多種類の無機塩中のどれが増殖を促しているかを解析した結果，第1リン酸カリウム（ KH_2PO_4 ）であることがわかっている。アルコール発酵能力が優れている *Saccharomyces cerevisiae* は C, D, G に，そして *Sacch. servazzii* は J にと，同じ属に分類されている酵母が広く分散した。増殖に必要な栄養物質の種類，あるいは濃度に大きな差があることをうかがわせる。ポンベ酒発酵酵母として知られる *Schizosaccharomyces pombe*，醤油や味噌醸造中にアルコール発酵して製品に風味を与える *Zygosaccharomyces rouxii* は，いずれも栄養物質が豊富な培地でだけ増殖が確認された。実験に使用した酵母は属レベルで広範囲にわたるように留意して選択してある。したがって，表3の結果から人間生活に密着したいわゆる有用酵母を，直ちに栄養源の豊かさと結びつけて議論するわけにはいかない。一つの種に属する数多くの菌株を比較実験する慎重さが今後の課題となっている。

低栄養培地上で数多くの酵母の増殖比較実験を行なった動機は，土壌で代表される低栄養源から分離された酵母と，食品で代表される高栄養源から分離される酵母の間に増殖に必要な栄養物質に定性的，定量的差が求められるかどうかを確かめることであった。表3に分類された酵母を，それらの分離源と実験で増殖が確認された培地との関連性を求めて，再整理してみた。表4がその結果の一部であるが，土壌から分離された酵母であっても高栄養培地でしか生育しない菌株（たとえば

表4 ■ 低栄養培地上での生育能力と菌株分離源の栄養環境との関連性

分離源の栄養環境		
	低栄養（土壌）	高栄養（蔗糖蜜，バナナ，ブドウ果汁，蜂蜜）
蒸溜水とアガロースだけのゲル上で増殖する菌株	<i>L. starkeyi</i> IAM 4753 <i>H. saturnus</i> R 263 <i>Cr. humicolus</i> JCM 1457	<i>C. boidinii</i> IFO 10035 <i>Rh. toruloides</i> IFO 0871
全成分を含む合成培地および YM 培地上でだけ増殖する菌株	<i>L. anomalus</i> JCM 5988 <i>Sacch. servazzii</i> JCM 1457 <i>T. globosa</i> IFO 0073	<i>Schiz. pombe</i> IFO 0342 <i>Zygosacch. rouxii</i> JCM 5924

L. anomalus）があったり，食品から分離された酵母でも水とアガロースだけの平板培地で増殖を示す菌株（*Candida boidinii* IFO 10035，*Rhodospiridium toruloides* IFO 0871）もあるなど，統一的な関連性はなかった。

一方，添加する栄養物質の数が少ないゲル上では増殖を示すが，数が多くなると増殖を示さなくなる（偏性低栄養）酵母は現われなかった。実験室内で菌株を継代保存するときには，広い範囲の酵母に共通して適用できる栄養分に富んだ培地を使用するのが通例である。また，筆者らの実験でも種菌の継代保存には YM 培地を使っている。そうした高栄養培地に生育してきた酵母を低栄養平板培地実験に使うのであるから，偏性低栄養酵母が検出できなかったのは当然の帰結である。

低栄養液体培地中での酵母の増殖

前節までに記述した内容から，低栄養平板培地で酵母の増殖実験を行なおうとすれば，ゲル化剤から混入する不純物の徹底的な除去が障害になることがわかった。幸い，蒸溜水中では酵母菌の増殖が観察されないで，そこへ少量ずつ栄養物質を溶解させた液体合成培地を使って以後の実験を展開させることにした。

液体培地実験に移るにもさまざまな気遣いが求められた。前述のように，半数近い種に属する酵母は糖を炭素源として増殖するときに酸素を必要とする。何種類かの酵母を使って再現性の良い増殖比較実験を行なうには，培地中へ酸素を充分に供給できる実験法を採用しなければならない。蒸溜水で徹底的に洗浄した試験管に培地を 5 ml ずつ分注し，洗浄したストッキング用ナイロン布で

表 5 ■ グルコース 0.01% 水溶液を基本とした液体培養実験における酵母菌の増殖倍率

蒸留水に溶解させた物質	<i>L. starkeyi</i> IAM 4753		<i>Sacch. servazzii</i> JCM 5179	
	OD ₆₆₀	全菌数	OD ₆₆₀	全菌数
グルコース単独 (基本)	1.42	1.13	0.68	0.61
グルコース、 ビタミン9種	1.47	1.20	0.41	0.37
グルコース、 多量無機塩類、 微量無機塩類	1.41	1.27	1.42	1.30
グルコース、 ビタミン9種、 多量無機塩類	1.46	1.48	1.52	1.47
グルコース、 ビタミン9種、 多量無機塩類、 微量無機塩類	1.48	1.80	1.59	1.59

丁寧に被覆した綿栓をつけ、25℃で毎分往復回数 60、振幅 7 cm とする振盪培養を実験条件として採用した。綿栓は発泡シリコン製の栓に比べて通気性が良好であること、綿栓から出やすい微細繊維の落下混入はナイロン布被覆で防げること、5 ml の培地量があれば必要な測定ができること、などが主たる理由である。

実験には、平板培地実験で最も低栄養な条件にしても増殖が確認されている表 3 の A のグループから *L. starkeyi* IAM 4753、さまざまな栄養源を与えないと増殖が確認できなかった J のグループからは *Sacch. servazzii* JCM 5179 を選び出して供した。それぞれの菌体を飢餓処理して種菌を用意するところまでは平板培地実験と同じである。種菌の接種量は 660 nm の濁度 (OD₆₆₀) で 0.10 とした。液体培地を使う通常の増殖実験に比べて多めの接種量にして、わずかな増殖も計測できるようにした。培養中に水分蒸発によって培地の濃縮が起こり、見かけの菌体密度が上昇することへの補正もした。

蒸留水にグルコースを 0.01% 溶解した溶液を基本とし、そこへ Wickerham の合成培地組成表にある B 群ビタミン 9 種、多量無機塩類、微量無機塩類などを逐次添加溶解し、pH 5.2 に調整して培地とした。それぞれの培地に酵母を接種してから 100 時間前後の培養を経て、その間に増殖した菌体量を濁度と全菌数で表わした (表 5)。

L. starkeyi はグルコース単独溶解培地中でさえ

OD₆₆₀ および全菌数ともに増大した。ビタミン 9 種、多量無機塩類、微量無機塩類が与えられるにつれて明らかに全菌数の増大が起こったが、OD₆₆₀ には大きな変化がなかった。グルコース単独溶解培地中の菌体は全成分溶解培地のそれに比べてサイズが大きく、菌体中にある脂肪球の肥大が顕著であった。その個々の菌体体積増大分が OD₆₆₀ の増大に表われた⁽²¹⁾。*Sacch. servazzii* はグルコース単独あるいはそこへビタミン 9 種を溶解した培地中では OD₆₆₀ および全菌数が減少した。ところが無機塩類を与えると確実に増殖し、無機塩類の必要性が高いことがわかった。

前節では、酵母にとって栄養とは何であろうか、と問題提起をしながら正面から取り組む考察を行なえなかった。生物が持つ機能の中で無生物との間にみられる相違点として増殖を指摘できる。増殖が起こるには親となる個体が必要であり、その個体を増殖能力を含めて健全に維持するには、少なくとも生物としての秩序性を保たせるだけのエネルギー源が必要であろう。酵母のような従属栄養生物にとって最もエネルギー源となりやすい物質はグルコースを代表とする糖である。蒸留水中にグルコースを単独に 0.01% だけ与えると、*L. starkeyi* は見かけ上わずかに増殖したが、*Sacch. servazzii* は増殖しなかった (表 5)。この場合でいう *L. starkeyi* の増殖は時間軸に対して無限に継続するわけではなく、比較的短い時間内に停止してしまう性質を持っている。増殖が停止しても個体が生存できるなら、外部から次の機会を与えられれば増殖を再開できる。栄養を考えると、個体の生存に必要な栄養と増殖に必要な栄養とを区別しなければならないだろう。

見かけの増殖活動を停止している酵母細胞が次に与えられる増殖の機会まで生存できる能力を判断しようとした実験がある。手法はきわめて単純で、蒸留水中に懸濁した *L. starkeyi* と *Sacch. servazzii* の生存率を経時的にエリトロシン B 法で測定した (図 3)。*L. starkeyi* は初めの数十時間は生存率が減少するが、約 50% に達するとその後は一定値を保つ。*L. starkeyi* の約 50% が死に至らなかった原因は、飢餓処理にさらされた酵母

図 3 ■ *L. starkeyi* (低栄養酵母) と *Sacch. servazzii* (非低栄養酵母) の蒸留水中における生菌率の経時変化

の約 50% が細胞周期上の安定な期にあったからと解釈される。安定な期にある細胞は、菌体内部の蓄積脂肪をゆっくりと消費しながら生存に必要な最少限の代謝を継続していると考えている。ただし、その生化学的証拠はまだ把握できていない。ところが、*Sacch. servazzii* は生菌率減少に歯止めがかからず、140 時間程度で 5% 以下になってしまった。個体の維持にさえ、外部から栄養物質の補給がなければ困難なのであろう。

仮に内部蓄積したエネルギー源の量とその利用能力の差が 2 種類の酵母の間に生存時間の差を生じさせるのであれば、*Sacch. servazzii* に対して一定時間後に生存率 50% を与えるグルコース量がこの酵母にとって 50% 生存に必要な栄養と受けとめられる。ところが、もしも酵母の生存率を支配する物質が代謝に直接関連し得ない物質、たとえば細胞内外で浸透圧のバランスをとるのに一時的に使われる非必須元素の電解質である場合に、これを栄養物質と呼んでよいのであろうか。そのあたりの解釈の仕方は研究者の立場によって相違が出てくるであろう。

細胞がただ生存するにとどまらずに増殖する場合を考える。細胞数が増える間には新たな細胞を構築する固有の有機化合物が生産される代謝があり、細胞中でそれらが機能する内部環境を構成するのに必要な無機イオン類が外部環境から取り込まれる。細胞数が出発時の 2 倍に増大した後に増殖が止まり、その停止時の培地には二酸化炭素のような代謝の最終産物以外に何も残らない理想状態を考えたとき、出発時に培地に存在した物質群

を細胞数倍増に必要な栄養物質と呼んでみたい。細胞数倍増に必要な栄養を構成する物質群の定量的内容は、観察の対象とする酵母細胞の種類によって変化するであろう。細胞固有の大きさの大小によって増殖に必要とする物質量が変化するからである。増殖の上限を 5 倍、10 倍へと大きくすれば、栄養物質群の量を 5 倍、10 倍にするだけでは満足されないかもしれない。その実験系内で生活している生物自身が相互に作り出す新しい環境因子が作用するからである。

このように、低栄養培地における酵母の生存や増殖を研究しようとするれば、従来型の研究手法だけでは結論に導きにくい面がある。いわば辺境の研究地域へと一人で旅立つ覚悟がなければ足を踏み出せないことになる。生きている状態の定義やら増殖という言葉の解釈の仕方など、他人から見れば言葉遊びのように見えながら、本人にとってはきわめて深刻な思索の世界に迷い込んだまま抜け出られなくなる危険さえはらんでいる。

自然科学に携わる者の一人として、研究では観察の対象とした系に関与する物質やエネルギーの、定性的定量的測定結果を最も信頼できる根拠として議論を進展させるべきだ、と自覚している。さりとて、慣れ親しんできた常識的な実験技術の範囲からは逸脱しているが、それ故にちょっと魅惑的な異次元の世界が目の前にあると、そこへ足を踏み込んでみたい欲望にも抗しきれない。節度を保ちつつ、自前の研究から自然の流れとして導かれてきた発想と実験の延長線上を、しばらくは歩んでみようと考えている。

文献

- 1) 飯塚 廣, 後藤昭二: “酵母の分類と同定法”, 東京大学出版会, 1969, p. 35.
- 2) H. J. Phaff, M. W. Miller & E. M. Mrak: “The Life of Yeasts”, Harvard University Press, 1978, p. 1.
- 3) J. A. Barnett, R. W. Payne & D. Yarrow: “Yeasts: Characteristics and Identification”, 2nd ed., Cambridge Univ. Press, 1990.
- 4) 後藤昭二: “微生物の分類と同定(上)”, 長谷川武治 編, 学会出版センター, 1984, p. 153.
- 5) 兎束保之: バイオサイエンスとインダストリー, 47, 225 (1989).
- 6) T. Naganuma, T. Yamaguchi & Y. Uzuka: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 35, 481 (1989).

- 7) R. L. Starkey : *J. Bacteriol.*, 51, 33 (1946).
- 8) 本江元吉 : “微生物工業” 朝井勇宣 編, 朝倉書店, 1956, p. 451.
- 9) H. J. Phaff & C. P. Kurtzman : “The Yeasts : a Taxonomic Study”, 3rd ed., ed. by N. J. W. Kreger-van Rij, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, 1984, p. 252.
- 10) L. J. Wickerham : *Tech. Bull.*, No. 1029, U.S. Dept. Agr. Washington D. C., 1 (1951).
- 11) 安藤 勉, 長沼孝文, 兎束保之 : 日本農芸化学会 1990 年度大会講演要旨集, p. 139 (1991).
- 12) 清水 潮 : “微生物学辞典”, 日本微生物学協会編, 技報堂出版, 1989, p. 398.
- 13) A. E. Wheals : “The Yeasts”, Vol. 1, 2nd ed., ed. by J. S. Harrison and A. H. Rose, Academic Press London, 1987, p. 283.
- 14) 伊崎道考, 長沼孝文, 兎束保之 : 日本農芸化学会 1991 年度大会講演要旨集, p. 139 (1991).
- 15) 兎束保之 : “微生物の探索, 分離, 育種”, シーエムシー, 1984, p. 115.
- 16) 服部 勉 : 化学と生物, 28, 307 (1990).
- 17) ルネ・デュボス : “パストゥール”, 長野 敬 訳, 河出書房, 1968, p. 99.
- 18) 西尾道徳 : “土壌微生物とどうつきあうか”, 農山漁村文化協会, 1988, p. 31.
- 19) 小玉健吉 : 微生物, 4, 139 (1988).
- 20) H. J. Phaff & W. T. Starmer : “The Yeast”, Vol. 1, 2nd ed., ed. by J. S. Harrison and A. H. Rose, Academic Press London, 1987, p. 123.
- 21) 長沼孝文, 兎束保之, 田中健太郎, 古賀哲郎 : 農化誌, 49, 335 (1975).

お知らせ

創立 40 周年記念平成 4 年度日本澱粉学会大会

主 催 : 日本澱粉学会

共 催 : アミラーゼ研究会

日 時 : 平成 4 年 9 月 10 日 (木) ~ 12 日 (土)

場 所 : 共立女子大学 共立講堂, 3 号館

プログラム :

9 月 10 日 (木) 40 周年記念式典, 基調講演, 記念講演, 総会, 学会賞授賞式および授賞講演, 懇親会

9 月 11 日 (金) 公開シンポジウム (無料) テーマ : 糖質科学・工学の新しい展望——生産・機能・利用
大会委員長挨拶 / イネにおける澱粉の合成・平野博之 (国立遺伝研) / オリゴ糖・多糖の酵素合成・田中俊雄 (大阪市大理) / 細胞認識と糖鎖・箱守仙一郎 (The Biomembrane Institute and Univ. Washington) / 糖鎖・糖質工学とレク

テン・渋谷直人 (農生研) / 糖質利用の新しい展望・日高秀昌 (明治製菓(株)生科研) / 調理科学における各種澱粉特性の利用・鈴木綾子 (大阪女子大基礎理学) / 新形質米の性状と調理特性・高橋節子 (共立女子大家政学)

9 月 12 日 (土) 一般講演

大会参加費は正会員 : 3,000 円, 学生会員 : 1,000 円, 懇親会費は正会員 : 7,000 円, 学生会員 : 3,000 円です。なお, 9 月 11 日 (金) 開催の公開シンポジウムは無料ですので多数ご参加下さい。

問合せ先 : 〒101 千代田区一ツ橋 2-2-1

共立女子大学家政学部 高橋節子, 内藤文子

Tel. 03-3237-2492, 2493 Fax. 03-3237-2688